Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Immunologische Studien an Pankreasfermenten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Reiner Hartmann

aus Berlin

1966

Dekan: Prof. Dr. Dr. Steinhardt
Referent: Prof. Dr. med. N. Henning

Tag der mündl. Prüfung: 21. 1. 1966

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Enzymol. biol. clin. *5:* 179–192 (1965)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg

Immunologische Studien an Pankreasfermenten

F. Scheiffarth, H. Götz und H. Hartmann

Zusammenfassung: Mit Hilfe der zweidimensionalen Immunodiffusion nach *Ouchterlony* und der Immunoelektrophorese nach *Grabar und Williams* wurden unter gleichzeitiger Anwendung des Amylasenachweises im Agargel untersucht:

α-Amylase aus Bakterien, Lipase aus Schweinepankreas und Pankreasextrakt des Menschen.

Gegen die einzelnen Substrate wurden Antiseren im Kaninchenversuch entwickelt und die beiden Systeme, Antigen und Immunserum, mit den angegebenen Geltechniken geprüft.

Als Ergebnis der agarelektrophoretischen und nachfolgenden Untersuchungen auf Amylaseaktivität ist festzustellen, daß sich Bakterienamylase von der α-Amylase des Pankreas vom Schwein und des Menschen elektrophoretisch unterscheidet. Untersuchungen auf immunologischer Basis ergaben, daß

1. gegen Amylase am frühesten und zugleich am intensivsten ein streng spezifischer Antikörper auftrat und daß das Präzipitat der Amylase-Anti-Amylase-Reaktion in seinem ganzen Verlaufe Fermentaktivität bewahrt hat,

2. gegen Lipase erst bei zweiter Kontrolle eine deutliche Präzipitatbildung nachweisbar war, und daß später mehrere Systeme, d. h. bis zu drei Präzipitationslinien, faßbar wurden. Eine unter ihnen erwies sich als amylaseaktiv,

3. gegen Pankreasextrakt – im Vergleich zu Amylase – ebenfalls weitaus schwächere und außerdem mehrere Präzipitine entwickelt wurden, von welchen wiederum ein System Amylaseaktivität zeigte.

Die Kreuzreaktionen stellten für Bakterienamylase eine weitgehende Artspezifität unter Beweis. Die einzelnen Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften der verwendeten Substrate verglichen und diskutiert.

Immunological Studies on Pancreas Ferments

Summary: Antisera were produced in rabbits against α-amylase from bacteria, lipase from pig pancreas and human pancreatic extract. The differences between the three antisera were studied by immunodiffusion according to *Ouchterlony* and immuno-electrophoresis according to *Grabar und Williams.* Assays of amylase activity after electrophoresis showed that the α-amylase from pig pancreas and from human pancreas behaved differently. Immunological studies showed that antibodies against α-amylase appeared first and that the enzyme activity persisted in the antigen-antibody precipitate. Lipase gave a much weaker response and several

precipitation lines appeared one of which was amylase-active. Antisera against human pancreatic extract gave several precipitation lines, one of which was amylase-active.

Kürzlich mitgeteilte agarelektrophoretische Untersuchungen an Seren und einigen Organextrakten, wie Leber-, Milz- und Pankreasextrakten [2, 12], haben gezeigt, daß die α-Amylase des Menschen als eine offenbar einheitliche Komponente im β_2/γ-Globulinbereich verankert ist. Dies deckt sich im wesentlichen mit früheren Ergebnissen der einschlägigen Literatur [7, 8, 9, 10]. Neuere inzwischen gesammelte Erfahrungen mit Agar-Ferment-Elektrophorese weisen darauf hin, daß dieser amylaseaktive Komplex, gemessen an der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, in wenigstens zwei Komponenten unterteilbar ist. Das konnte vor allem im Harn und Serum von bisher 13 untersuchten Kranken mit Pankreatitis aufgezeigt werden. Diese Beobachtung legt die Frage nahe, ob selbst individual-eigene Amylase unter dem Einfluß pathologischer Prozesse, etwa in Abhängigkeit von der Organherkunft, Unterschiede aufweist.

In nachfolgenden Untersuchungen sollte deshalb an Hand rein dargestellter Amylasepräparate im Vergleich zu anderen Pankreasfermenten eine Charakterisierung dieses Enzyms unter Berücksichtigung ihrer elektrophoretischen, immunologischen und färberisch darstellbaren Proteineigenschaften vorgenommen werden.

Versuchsanordnung und Methodik

1. *Versuchsanordnung:*

Mit Hilfe des *Ouchterlony*-Schalentestes und der Immunoelektrophorese nach *Grabar und Williams* wurden unter Verwendung des Diastasenachweises im Agargel und verschiedener Färbeverfahren folgende Substrate untersucht:

Amylase (α-Amylase aus Bakterien, mit einer Aktivität von 2500 SKB-Einheiten per g bei 30° C, Firma Theodor Schuchardt, München),
Lipase (aus Schweinepankreas rein, Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg),
Pankreasextrakt des Menschen (die Organe wurden uns freundlicherweise aus dem pathologischen Institut der Universität Erlangen zur Verfügung gestellt *).

Gegen die einzelnen Substrate wurden Antiseren im Kaninchenversuch entwickelt und die beiden Systeme, Antigen und Antikörper, mit den angegebenen Geltechniken geprüft.

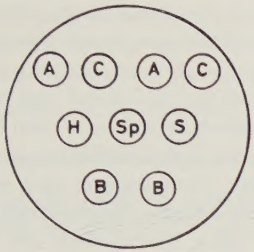
In einem weiteren Analysensatz wurden menschlicher Speichel und Harn und menschliches Serum mit erhöhter Amylaseaktivität mituntersucht.

Anmerkungen zu den Analysensätzen: *Ouchterlony:* Es wurden in Einzelanalysen die jeweiligen Antigen-Antikörper-Systeme für

* Direktor: Prof. Dr. *E. Müller*

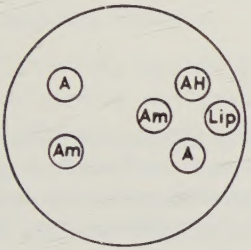
Amylase-Serum Kaninchen A
Lipase-Serum Kaninchen B
Pankreasextrakt-Serum Kaninchen C

angesetzt, ferner wurde zur Prüfung von immunologischen Identitäts- bzw. Kreuzreaktionen folgende Versuchsanordnung getroffen:

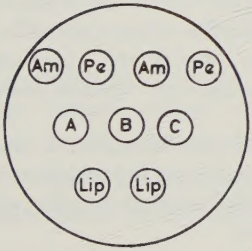


A = Serum Kaninchen A
B = Serum Kaninchen B
C = Serum Kaninchen C
H = Harn (Mensch, diastasehaltig)
S = Serum (Mensch, diastasehaltig)
Sp = Speichel (Mensch)

Außerdem wurden noch folgende Analysensätze gewählt:



A = Serum Kaninchen A
Am = Amylase
AH = Antihumanserum
Lip = Lipase



A = Serum Kaninchen A
B = Serum Kaninchen B
C = Serum Kaninchen C
Am = Amylase
Pe = Pankreasextrakt
Lip = Lipase

Immunoelektrophoretisch wurden zunächst die verschiedenen Antigene aufgetrennt und gegen die spezifischen Antiseren geprüft.

Außerdem wurden die verschiedenen Antigene der elektrophoretischen Trennung unterworfen und mit jedem der Antiseren getestet, schließlich wurden die verschiedenen Antiseren gegen die spezifischen Antigene (im Längskanal) geprüft. Diese Versuchsanordnung sollte der Lokalisation des Antikörpers im Immunserum dienen.

Die Amylasereaktion wurde angewandt sowohl bei einfacher Elektrophorese der verschiedenen amylaseaktiven Substrate als auch der spezifischen Ferment-Antiferment-Präzipitate im *Ouchterlony*-Schalentest und der Immunoelektrophorese.

2. *Methodik:*

a) *Herstellung der Lösungen.* Amylase: Zu 200 mg Amylase wurden 4 ml phys. NaCl gegeben und mit dem Ultra-Turrax-Zerstäuber[1] vermischt. Lipase: Ebenso wurden zu 200 mg Lipase 4 ml phys. NaCl gegeben und mit dem Ultra-Turrax-Zerstäuber vermischt. Zubereitung des Pankreasextraktes: Fettkapsel und Bindegewebe wurden von dem Pankreaspräparat entfernt und anschließend 90 min gewässert, sodann grob zerkleinert, mit phys. NaCl im Verhältnis 1:2 versetzt und in einem Starmixgerät[2] zertrümmert. Das so gewonnene Substrat wurde 30 min lang bei etwa 4000 U/min zentrifugiert. Von den entstandenen drei Schichten wurde die mittlere abpipettiert, im Verhältnis 1:2 mit phys. NaCl versetzt und mit dem Ultra-Turrax-Zerstäuber emulgiert. Dieser wässrig-rötliche Organextrakt wurde im Dialysierschlauch[3] gegen 20% Kollidon auf einen Eiweißgehalt von 1,5 bis 2 g% eingeengt.

b) *Herstellung der spezifischen Antiseren:*

Für jedes Antigen wurde je ein Kaninchen zur Antikörperproduktion in Versuch genommen.

Kaninchen A für Amylase
Kaninchen B für Lipase
Kaninchen C für Pankreasextrakt vom Menschen.

Vor Sensibilisierungsbeginn wurden im *Ouchterlony*-Schalentest (zweidimensionale Diffusion) die Seren der Tiere auf etwa unspezifische Präzipitine gegen die einzelnen Fermentantigene geprüft, außerdem papierelektrophoretisch untersucht. Jedem Kaninchen wurde danach das entsprechende Fermentantigen bzw. Pankreasextrakt in folgender Weise appliziert:

Je 1 ml des antigenen Substrates wurde mit 4 ml Freundschem Adiuvans[4] mit dem Ultra-Turrax-Zerstäuber emulgiert und hiervon 1,5 ml i.m. injiziert. Gleichzeitig wurden demselben Tier 0,5 ml einer im Verhältnis 1:1 mit phys. NaCl hergestellten Antigenlösung i.v. injiziert. Nach Ablauf einer Woche wurde eine i.-m.-Reinjektion vorgenommen mit 1,5 ml der angegebenen Fermentlösung (ohne Freundsches Adiuvans).

Während der Sensibilisierungsphase wurden bei allen Tieren am 4., 8., 21. und 32. Tag nach Versuchsbeginn Kontrolluntersuchungen mit Geltechnik und Papierelektrophorese, nach Auftreten der ersten Präzipitationsphänomene schließlich auch mit der Immunoelektrophorese vorgenommen.

c) *Methoden zur Aufklärung von Antikörpern:*

Zweidimensionale Immunodiffusion nach Ouchterlony [11]. Zum Nachweis von

[1] Fa. Janke und Kunkel, Staufen i. Breisgau
[2] Fa. Auer, Berlin
[3] Membranfiltergesellschaft Göttingen
[4] Bacto-adiuvant, complete Freund, Difco-laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

gebildeten Präzipitinen im Serum der sensibilisierten Kaninchen wurde als Vorversuch zunächst der *Ouchterlony*-Schalentest herangezogen.

Immunoelektrophorese nach Grabar und Williams [3, 5, 16]: Die Immunoelektrophorese wurde zum Zweck der Differenzierung der mit Agar-Diffusionstechnik beobachteten Präzipitate vorgenommen. Färbemethoden zur Charakterisierung der immunoelektrophoretisch darstellbaren spezifischen Ferment-Antiferment-systeme:

Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B
Kohlenhydratfärbung mit Schiffschem Reagenz und einprozentiger Perjodsäure
Lipoproteidfärbung mit Sudanschwarz B
[Literatur für die Färbungen bei 1, 4, 6, 13].

d) *Amylasenachweis im Agargel:*

Methodisch wurde im wesentlichen nach den Angaben von *Heinkel* [6, 7] sowie *Scheiffarth und Götz* [2, 12] vorgegangen.

Ergebnisse

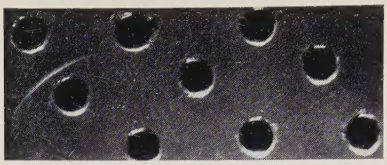
1. *Elektrophoretische und fermentative Charakterisierung der verwendeten antigenen Substrate:*

Auf Grund der agarelektrophoretischen Trennung und nachfolgenden Bestimmung der Amylaseaktivität konnte festgestellt werden, daß die *Bakterienamylase* im Bereich der β_1-Globuline, d.h. von der Auftragestelle unmittelbar kathodisch, zur Darstellung gelangte. Die als *Lipase vom Schweinepankreas* gelieferte Substanz zeigte in einem Bereich von der Auftragestelle bis in die Zone der γ-Globuline eine intensive Amylaseaktivität. Jenseits der Auftragestelle fand sich in Richtung der Anode ein schwach rotviolett gefärbter Bezirk, der dem α_2-Bereich zuzuordnen ist.

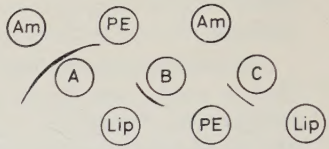
Der *Pankreasextrakt vom Menschen* ließ im Bereich der β/γ-Globuline eine relativ scharf umschriebene intensive Amylaseaktivität erkennen. Die Benennung der Komponenten erfolgte nach den bekannten Fraktionen eines unter gleichen Bedingungen agarelektrophoretisch getrennten menschlichen Serums.

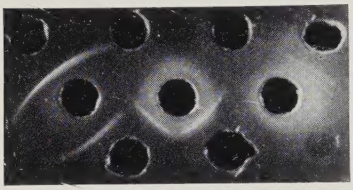
2. *Immunologische Ergebnisse:*

a) *Nach zweidimensionaler Immunodiffusion nach Ouchterlony.* Es konnte festgestellt werden, daß gegen *Amylase* am frühesten, d.h. bereits bei erster Kontrolle – und zugleich am intensivsten ein spezifisches Präzipitat auftritt, das einwandfrei Amylaseaktivität zeigt (s. Abb. 1 und 2). Gegen *Lipase* konnte bei erster Kontrolle zwar

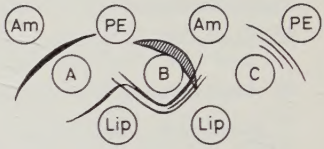


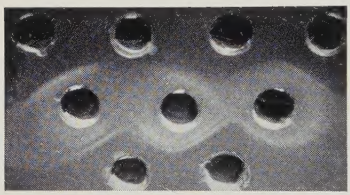
1. Kontrolle





3. Kontrolle





4. Kontrolle

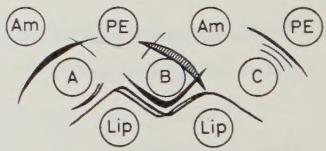


Abb. 1. Zweidimensionale Immunodiffusion nach *Ouchterlony:* Sensibilisierungsergebnisse der mit Bakterienamylase, Lipase aus Schweinepankreas sowie menschlichem Pankreasextrakt sensibilisierten Kaninchen bei 1., 3. und 4. Kontrolle, wobei Antigen und Antiseren auch in kreuzweiser Anordnung getestet wurden.

Fig. 1. Two-dimensional immunodiffusion according to *Ouchterlony*. Results after sensibilization with bacterial amylase (Am), lipase from pig pancreas (Lip) and human pancreas extract (PE). 1st, 3rd and 4th control of the sensibilized rabbits.

ebenfalls ein Präzipitin nachgewiesen werden, es lag jedoch in weitaus geringerer Konzentration vor. Erst bei zweiter Kontrolle konnte gegen Lipase eine einwandfreie Präzipitationslinie aufgezeigt werden, bei dritter Kontrolle waren zwei und bei vierter Kontrolle schließlich drei Präzipitationssysteme differenzierbar. Gegen *Pankreasextrakt* wurde bei erster Kontrolle eine zarte Präzipitationslinie nachgewiesen, die bei zweiter Kontrolle wesentlich deutlicher hervortrat. Bei dritter und vierter Kontrolle fügten sich zwei weitere, allerdings schwach ausgeprägte Linien hinzu.

Zur Aufklärung immunologischer Kreuz- bzw. Identitätsreaktionen konnte folgendes gezeigt werden:

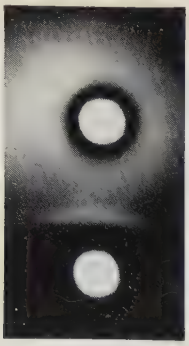


Abb. 2. Fermentnachweis

Abb. 2. Nachweis von Amylaseaktivität des Präcipitates zwischen Bakterienamylase und spezifischem Antiserum.

Fig. 2. Detection of amylase activity of the precipitate between bacterial amylase and specific antiserum.

Erklärungen: Am = Amylase, Pe = Pankreasextrakt, Lip = Lipase

Anti-Amylase-Serum wies eine partielle Identitätsreaktion mit einem der Eiweißsysteme des Lipasesubstrates auf; auf Grund der letzten Kontrolle muß sogar eine Identitätsreaktion mit diesem angenommen werden.

Anti-Amylase-Serum zeigte gegen Pankreasextrakt erst bei letzter Kontrolle eine zarte Linie, die das spezifische Präzipitat zwischen Amylase und Anti-Amylase-Serum kreuzte.

Anti-Lipase-Serum ergab gegen Amylase ein Phänomen, das durch seine relativ schwache aber breit verlaufende Präzipitatbildung auffiel. Anti-Lipase-Serum reagierte mit Pankreasextrakt erst bei letzter Kontrolle unter Bildung einer schwachen Linie, die das Präzipitat zwischen Anti-Lipase und Amylase kreuzte.

Anti-Pankreas ergab gegen Amylase in keinem Fall, gegen Lipase ein deutliches Präzipitat, das kontinuierlich in eines der spezifischen Lipase-Anti-Lipase-Systeme überging. Vom Antigen aus betrachtet, reagieren die Substrate, wie bereits dargelegt, mit ihrem spezifischen Antiserum unter Bildung von ein- bis maximal drei Präzipitationslinien. Darüber hinaus ergaben sich Reaktionen zwischen Amylase und Anti-Lipase-Serum, nicht aber zwischen Amylase und Anti-Pankreas-Serum. Es ergaben sich ferner Präzipitatbildungen zwischen Lipase und Anti-Amylase sowie zwischen Lipase und Anti-Pankreas-

Serum. Pankreasextrakt hingegen reagierte nur mit Anti-Lipase-Serum. In der letzten Kontrolle wurde jeweils ein zartes Präzipitat zwischen Pankreasextrakt und Anti-Amylase sowie zwischen Pankreasextrakt und Anti-Lipase-Serum sichtbar. Dieses kreuzte in jedem der beiden Fälle die Präzipitationslinien zwischen Amylase und Anti-Amylase bzw. Amylase und Anti-Lipase (Abb. 1).

Die verschiedenen gewonnenen Anti-Seren zeigten weder gegen menschlichen Harn mit erhöhter Diastaseaktivität noch gegen menschliches diastasehaltiges Blut, noch gegen menschlichen Speichel eine Immunreaktion.

Bei Prüfung von Amylase und Lipase gegen Antihumanserum wurden lediglich gegen Lipase zwei Präzipitationslinien nachgewiesen. Pankreasextrakt ergab in dieser Versuchsanordnung maximal vier Präzipitationssysteme.

b) *Immunoelektrophoretische Ergebnisse* (Abb. 3 a und 3 b): *Amylase:* Amylase ergab mit Anti-Amylase ein Präzipitat, das als einheitlicher,

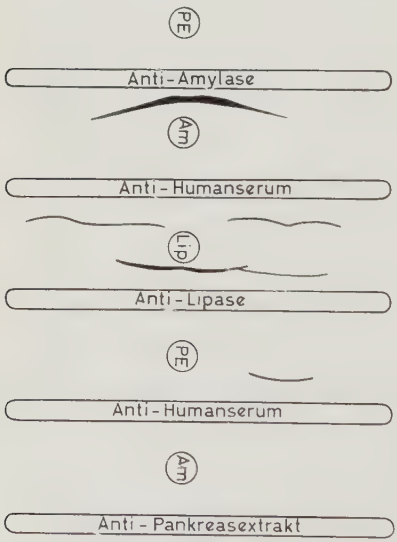


Abb. 3a

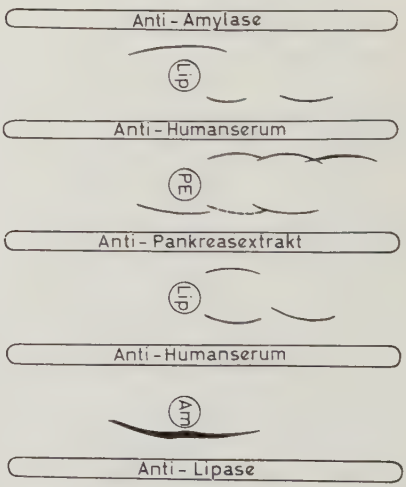


Abb. 3b

Abb. 3a und 3b. Halbschematische Darstellung der immunoelektrophoretischen Ergebnisse bei der Differenzierung verschiedener Pankreasfermente gegen spezifische und unspezifische Antiseren (elektrophoretische Wanderungsrichtung hier von links nach rechts).

Fig. 3a and 3b. Immunoelectrophoretic results of the interactions between different pancreatic enzymes and specific and non-specific antisera.

jedoch an zwei Stellen ausgebuchteter Bogen imponierte. Er erstreckte sich etwa vom α_1- bis in den β_1-Globulin-Bereich. Dasselbe Präzipitationsphänomen ergab sich zwischen Amylase und Anti-Lipaseserum. Hingegen kam zwischen Amylase und Anti-Pankreasserum sowie zwischen Amylase und Anti-Humanserum keine Linie zur Darstellung.

Lipase: Lipase ergab mit Anti-Lipase ein Präzipitat, das in Form und Ausmaß weitgehend dem der Amylase entsprach. Es war insgesamt jedoch schwächer ausgeprägt. Darüber hinaus erkannte man eine zarte Linie mit der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von α_1-Globulinen, welche die vorgenannte Linie in ihrem anodischen Anteil berührte. Gegen Anti-Amylase zeigte sich im Bereich um die Auftragestelle eine lang gestreckte feine Präzipitationslinie. In einzelnen Analysen fand sich außerdem weiter anodisch ein schwach ausgeprägtes kurzbogiges Präzipitat. Zwischen Lipase und Anti-Pankreas kam in einer Zone vom α_1- bis in den β_1-Globulin-Bereich eine schwache Präzipitationslinie zur Darstellung. Die Reaktion gegen Anti-Humanserum verlief unter Bildung zweier zarter ineinander übergehender Präzipitatbögen, die aus dem α_2-Bereich bis weit in die Zone der Albumine (oder Präalbumine) reichten. Hauchartig ergab sich auch eine Linie im Bereich der β- und γ-Globuline.

Pankreasextrakt: Pankreasextrakt zeigte gegen sein Immunserum mindestens zwei Präzipitate, von denen eines diesseits und jenseits der Auftragestelle als jeweils flacher Bogen verlief, das andere wohl mit einer Wanderungsgeschwindigkeit mit α_1-Globulinen zu vergleichen war. Zwischen den beiden fand sich mehrfach eine dritte Linie, die allerdings nicht in allen Analysen reproduzierbar war. Gegen Anti-Amylaseserum wie auch gegen Anti-Lipaseserum konnte kein Präzipitat nachgewiesen werden; dagegen ergaben sich bei Diffusion der elektrophoretisch getrennten Fraktionen gegen Anti-Humanserum insgesamt drei Präzipitationslinien. Eine lag weit anodisch, eine zweite etwa im Bereich der α_1-Globuline, die dritte zwischen dieser und der Auftragestelle.

c) *Charakterisierung der nachgewiesenen Präzipitate:* Anhand der immunoelektrophoretischen Phänomene wurde versucht, unter Anwendung verschiedener kombinierter Ferment- und Färbeverfahren die einzelnen Systeme nach ihrer Amylaseaktivität, Glyco- und Lipoproteidnatur und nach ihrer Anfärbbarkeit mit Amido-Schwarz 10 B näher aufzuklären.

Amylaseaktivität zeigten die Präzipitate der Amylase gegen Anti-Amylase, der Lipase gegen Anti-Amylase sowie eine Linie des Lipase-Anti-Lipase-Systems.

Bei Färbung mit Perjodsäure und Schiffschem Reagenz konnten die Präzipitate zwischen Amylase und Anti-Amylase sowie zwischen Lipase und Anti-Amylase, desgleichen zwischen Lipase und Anti-Lipase nur ganz schwach angefärbt werden. Dagegen ließen sich alle anderen Präzipitationssysteme färberisch darstellen. Die Intensität der Reaktion entsprach in diesen Fällen in etwa dem Ausmaß der Präzipitatbildung. Bei Färbung mit Sudan-Schwarz ließ lediglich das Präzipitat der Amylase-Anti-Amylase-Reaktion eine zarte Färbung erkennen. Die Proteinfärbung erfaßte sämtliche beschriebenen Präzipitatbögen.

d) *Beobachtung und Befunde an den in Versuch genommenen Tieren:* Die papierelektrophoretischen Ausgangswerte zeigten die für Kaninchen normalen Werte. Bei dritter Kontrolle konnte insgesamt eine geringfügige Hypalbuminämie mit relativer Vermehrung der α_1- und der β_1-Globuline festgestellt werden. Die Verschiebungen fielen jedoch noch in den Bereich der physiologischen Schwankungsbreite. Auch bei letzter Kontrolle konnten keine dysproteinämischen Phänomene, insbesondere auch keine Globulinvermehrung aufgezeigt werden. Auffällig war bei Blutentnahme zum Zeitpunkt der ersten und ebenso der zweiten Kontrolle, daß bei Kaninchen B (mit Lipase behandelt) Hämolyse eintrat. Blut und Serum der Tiere A und C waren dagegen bei allen Blutentnahmen unauffällig.

Diskussion

Das Studium der in vorliegender Arbeit verwendeten Fermente, Amylase aus Bakterien, Lipase aus Schweinepankreas sowie Pankreasextrakt des Menschen (Leichenorgan), hat bei einfacher Elektrophorese im Agargel und nachfolgender Prüfung auf Amylaseaktivität gezeigt, daß in all diesen Substraten quantitativ zwar unterschiedlich, aber qualitativ einwandfrei beweisbar, stärkespaltende Fermente enthalten sind. Der Sitz dieser Fermente unterscheidet sich allerdings insofern, als die im Schweinepankreas ebenso wie die im menschlichen Pankreasextrakt enthaltene Amylase im Bereich der β/γ-Globuline, die der Bakterienamylase im Bereich der β_1-Globuline liegt. Bereits hierin ist ein species spezifischer Unterschied stärkespaltender Enzyme

zu sehen. Daß es sich hierbei nicht etwa um Varianten in Abhängigkeit von der Organherkunft handeln kann, wird dadurch unterstrichen, daß frühere elektrophoretische Untersuchungen an Pankreasextrakten [7, 8, 10] sowie kürzlich mitgeteilte eigene Studien an menschlichen Organextrakten [2, 12] und inzwischen vorgenommene weitere Untersuchungen an menschlichem Speichel, Serum, Harn und menschlicher Galle gezeigt haben*, daß amylaseaktive Faktoren ausschließlich im β/γ-Globulinbereich mit nur geringfügigen elektrophoretischen Wanderungsdifferenzen nachweisbar werden. Somit scheint sich ein elektrophoretisch differenzierbarer speciesgebundener Grundtypus des fermenttragenden Proteins zu ergeben.

Die Antigenstudien haben ferner gezeigt, daß Lipase keineswegs als gereinigtes Substrat zur Verfügung stand; offenbar stellt dies bei Gewinnung von Amylase aus Pankreasextrakten ein technisches Problem dar. Pankreasamylase des Tieres (Schwein) sowie menschliche Amylase verhalten sich elektrophoretisch gleichartig. Die immunologischen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das Amylasepräparat hochgereinigt vorlag und daß Amylase streng spezifische Antigeneigenschaften besitzt, wie aus den angesetzten Kreuzreaktionen hervorgeht. Die Tatsache, daß gegen Amylase am frühesten und intensivsten Präzipitine auftraten, mag damit zusammenhängen, daß Amylase (Bakterienamylase) für das Kaninchen relativ heterolog war. Die erwiesene Spezifität der Bakterienamylase ist nicht nur fermentgebunden, sondern auch speciesgebunden.

Die Beobachtungstatsache, daß im Präzipitat zwischen Amylase und Anti-Amylase von Kaninchen die stärkespaltende Aktivität erhalten bleibt, kann damit erklärt werden, daß die Antikörperbildung nur gegen die Trägerfraktion eines fermentaktiven Proteinkomplexes erfolgt oder aber, daß die Präzipitatbildung Ausdruck einer rein physikalischen Koppelung darstellt, wobei die Eigenschaften von Antigen und Antikörper erhalten bleiben. Dies entspricht den Erfahrungen mit anderen fermentaktiven Proteinen, so z.B. Ceruloplasmin (Oxydase) [4, 13, 14, 15], esteraseaktive Komponenten [4] u.a.m. Damit entfallen die Hoffnungen auf frühere Modellvorstellungen, wobei immunologische Ferment-Anti-Ferment-Prinzipien für die Koppelung und damit Hemmung von Fermentreaktionen für therapeutische Zwecke angewandt werden könnten.

Immunoelektrophoretisch muß auf Grund der Doppelkrümmung

---

* Unveröffentlicht

der Präzipitationslinie eine Inhomogenität der Bakterienamylase allerdings mit immunologischer Identitätsreaktion zwischen zwei Komponenten angenommen werden. Dieses Präzipitat ist offenbar ein geringfügig lipidhaltiges Protein. Durch Kohlenhydratfärbung läßt es sich färberisch nur mit einer Spur darstellen.

Die gegen Lipase entwickelten drei Präzipitationssysteme können als Beweis für die Existenz von mindestens drei Komponenten im angebotenen Substrat angesehen werden. Eine davon ist auf Grund der Identitätsreaktion sicher mit Amylase, eine weitere mit Lipase aus Humanpankreas identisch. Die lipaseaktive Fraktion ist elektrophoretisch wahrscheinlich als eine schnell wandernde α_2-Komponente zu betrachten, sie spricht stärker auf eine Kohlenhydratfärbung an, obwohl das Präzipitat sehr viel schwächer ist als die amylaseaktive Fraktion. Die mit einem Anti-Pankreasserum darstellbare Linie entspricht hinsichtlich ihrer Position und der Kohlenhydratfärbbarkeit weitgehend dieser zuletzt genannten Komponente. Die mit Anti-Humanserum auspräzipitierten Systeme entsprechen in keinem Fall den bisher beschriebenen Präzipitaten (also gegen Anti-Lipase erzeugten), sie stellen deshalb Immunpräzipitate dar, die zumindest eine partielle Identität mit Serumeiweißkörpern (Blut?) wahrscheinlich machen. Sie könnten als Glykoproteid-Komplexe bezeichnet werden.

Die gegen menschlichen Pankreasextrakt zeitlich wesentlich später auftretende und insgesamt schwächere Präzipitinbildung läßt vermuten, daß bei diesem antigenen Substrat der Eiweißgehalt zu gering ist oder, daß für Kaninchen das menschliche Pankreasprotein im Gegensatz zum Bakterieneiweiß (Amylase!) zu wenig heterolog ist.

Weiterhin fällt auf, daß bei letzter Kontrolle je ein Präzipitat gegen die Antiseren des Tieres A (Anti-Amylase!) und B (Anti-Lipase!) auftrat, die ihrerseits jedoch komplette Kreuzreaktionen zum Amylase- und Lipase-System zeigten. Wahrscheinlich liegt hier ein Hyperimmunisierungseffekt mit Bildung von sog. Nebenpräzipitinen vor, die durch ihre Unspezifität ausgezeichnet sind. Die ungleichviel bessere Präzipitatbildung gegen Antihumanserum beweist die Verwandtschaftsreaktion mit wenigstens einigen speciesspezifischen Systemen, die jedoch kaum eine gleichzeitige Organspezifität demonstrieren.

Die Versuchsanordnung der verschiedenen menschlichen Körperflüssigkeiten mit erhöhter Amylaseaktivität gegen optimale Antiseren der Tiere A, B und C läßt den Schluß zu, daß diese Humanamylase Artspezifität aufweist. Die bei Immunoelektrophorese dargestellten

Fraktionen von Lipase und Pankreasextrakt gegen Antihumanserum beweisen umgekehrt, daß alle diese Präzipitate außerhalb der für die Amylase charakteristischen Präzipitationslinien liegen.

Schließlich ist bei den während der Sensibilisierung mit Lipase und menschlichem Pankreasextrakt behandelten Tieren ein fermentaktiver Hämolyseeffekt zu diskutieren.

Literatur

1. *Götz, H.; Berg, G.* und *Scheiffarth, F.:* Methodische Grundlagen der Immunoelektrophorese. Z. ImmunForsch. *114:* 72 (1957).
2. *Götz, H.; Scheiffarth, F.* und *Hoffmann, D.:* Diastasenachweis in einigen menschlichen Organextrakten mit Hilfe der Elektrophorese im Agargel. Z. Gastroenterologie *2:* 76 (1964).
3. *Grabar, P.:* Étude sur les protéines à l'aide de méthodes immuno-chimiques. Bull. Soc. Chim. biol. *36:* 65 (1954).

4a *Grabar, P.* et *Burtin, P.:* Analyse immuno-électrophorétique. Masson, Paris 1960.

4b *Grabar, P.* et *Burtin, P.:* Immunoelektrophoretische Analyse. (Elsevier, Amsterdam 1964).

5a *Grabar, P.* et *Williams, C. A.:* Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. Biochim. biophys. Acta *10:* 193 (1953).

5b *Grabar, P.* et *Williams, C. A.:* Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. biophys. Acta *17:* 67 (1955).

6. *Heinkel, K.:* in *Henning, N.:* Klinische Laboratoriumsdiagnostik, 2. Aufl. (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1960). pp. 431–437
7. *Henning, N.* und *Heinkel, K.:* Untersuchungen über die Äthioninpankreatitis der Ratte. Z. exp. Med. *120:* 221 (1953).
8. *Kinzlmeier, H.:* Die elektrophoretische Aufspaltung von Pankreasextrakten. Verh. dtsch. Ges. Verdau.-Stoffwechselkr. (XVI. Tag. 1952), ersch. Hansisches Verlagskontor Lübeck 1953, pp. 237–239.
9. *Nachkov, D.* et *Nachkova, O.:* Études immunoélectrophorétiques sur les protéines des tissues hépatiques normaux et infectés par virus (Institut d'immunologie, Sofia 1960).
10. *Norpoth, L.; Cloesges, J.* und *Schultze, M.:* Elektrophoretische und papierchromatographische Untersuchungen an menschlichen Pankreassäften. Verh. dtsch. Ges. Verdau.-Stoffwechselkr. (XVI. Tag. 1952), ersch. Hansisches Verlagskontor Lübeck 1953, pp. 222–226.
11. *Ouchterlony, Ö.:* Antigen antibody reactions in gels. Acta path. microbiol. scand. *26:* 507 (1949).
12. *Scheiffarth, F.* und *Götz, H.:* Eine Methode zum Diastasenachweis agarelektrophoretisch getrennter Proteingemische. Klin. Wschr. *42:* 130 (1964).
13. *Scheiffarth, F.; Götz, H.* und *Knopff, H.:* Die Bedeutung kombinierter Färbeverfahren nach immunoelektrophoretischer Analyse pathologischer Seren. Acta haemat., Basel *26:* 169 (1961).

14. *Uriel, J.:* Étude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose. Bull. Soc. Chim. biol. *39:* Suppl. I, 105 (1957).
15. *Uriel, J.; Götz, H.* et *Grabar, P.:* Étude de la céruloplasmine du sérum humain par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique. Microdétection colorimetrique du cuivre lié aux protéines. Schweiz. med. Wschr. *87:* 431 (1957).
16. *Williams, C. A.* and *Grabar, P.:* Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum. J. Immunol. *74:* 158 (1955).

Adresse der Autoren: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. H. Götz und H. Hartmann (D), Medizinische Universitätsklinik, Krankenhausstr. 12, *8520 Erlangen* (Deutschland)

LEBENSLAUF

Am 30.9.1939 wurde ich, Reiner Hartmann, als driites von vier Kindern dem Ehepaar Dr.med.Werner Hartmann und seiner Frau Gertraut geb.Kamischke zu Berlin geboren.Nach der Evakuierung 1943 aus Berlin lebte ich bis 1949 in Erfurt, wo ich die Volksschule besuchte.Im Oktober 1949 siedelte die Familie in die Bundesrepublik über.Nach einem halbjährigem Aufenthalt in Meringhausen / Waldeck zog die Familie nach Wuppertal.Hier besuchte ich bis 1960 das altsprachliche - humanistische Wilhelm - Dörpfeld - Gymnasium, an dem ich am 11.3.1960 das Abitur bestand.

Das medizinische Studium nahm ich an der Friedrich - Alexander - Universität Erlangen - Nürnberg auf,an der ich am 4.8.1962 mein Physikum bestand.Nach je einem Semester Studium in Göttingen (WS.1962/63) und Heidelberg (SS 1963) kehrte ich im Wintersemester 1963/64 nach Erlangen zurück.Am 14.1.1966 schloß ich mein medizinisches Studium mit dem Staatsexamen ab.